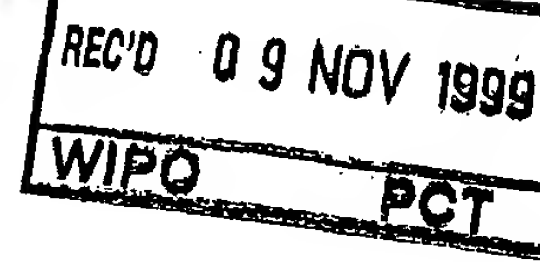


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung**

EP 99 / 7518

Die Hoechst Research & Technology Deutschland GmbH & Co KG in Frankfurt
am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Polyglucan und Polyglucanderivate erhältlich aus Amylosucrase
biokatalytischer Herstellung und biogener Stoffe"

am 9. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in:
Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 12 P, C 08 B und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Juni 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

EBer

Aktenzeichen: 198 46 492.4

Polyglucan und Polyglucanderivate erhältlich aus Amylosucrase biokatalytischer Herstellung und biogener Stoffe

5

Die Erfindung hat zum Gegenstand die Herstellung von Polyglucan und Polyglucanderivaten mittels Amylosucrase aus biokatalytischer Herstellung und biogener Stoffe und ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung.

-
- 10 Die biotechnologische Industrie ist interessiert an der Herstellung von neuen biologisch verträglichen Stoffen und Verfahren zu deren kostengünstigen Herstellung.

- Die Herstellung von linearer Polyglucan mittels biokatalytischer Herstellung ist
15 beschrieben in WO 95/31553. Im Rahmen dieser Erfindung wird sich ausdrücklich auf diese Schrift bezogen. Insbesondere zeigt die biokatalytisch hergestellte Amylosucrase die Aktivität der nativen Amylosucrase.

- WO 95/31553 beschreibt die Herstellung linearer Polysaccharide mittels
20 Biokatalyse (ebenso: Biotransformation), wobei das lineare Polysaccharid durch katalytische Reaktion von monomeren Grundbausteinen wie oligomeren Sacchariden, z.B. von Mono- und / oder Disacchariden hergestellt wird, indem ein sogenannter Biokatalysator, üblicherweise ein Enzym, unter geeigneten Bedingungen verwendet wird. Insbesondere wird Poly(1,4-alpha-D-glucan) in WO

-
- 25 95/31553 mittels einer Polysaccharidsynthase, die alpha-1,4-Glucantransferase oder synonym Amylosucrase, hergestellt. WO 95/31553 offenbart zudem eine Nukleinsäuresequenz, welche in E. coli zu einem Protein mit der Aktivität einer Amylosucrase exprimiert.

- 30 Die derart biokatalytisch erhaltenen linearen Polymere haben in vielen Anwendungen gegenüber verzweigten Polymeren einen Anwendungsvorteil hinsichtlich der Verarbeitbarkeit oder spezieller Eigenschaften, wie zum Beispiel die mechanische Stabilität und Beanspruchbarkeit. Darüber hinaus sind aber auch

gerade im pharmazeutischen (Human- und Veterinärbereich), medizinischen (Human- und Veterinärbereich), kosmetischen oder agrochemischen Bereich Anwendungen von großer kommerzieller Wichtigkeit, bei denen Eigenschaften oder Eigenschaftskombinationen benötigt werden, die durch lineare Polymere entweder nicht erhalten werden oder aber deren spezielle Eigenschaften für eine Anwendung in den oben genannten oder anderen Anwendungsbereichen über das für die spezielle Anwendung notwendige Maß hinausgehen. Das Erreichen spezieller Eigenschaften ist mit höheren Herstellungskosten verbunden. Sofern diese Eigenschaften in der Anwendung nicht benötigt werden, ist diese Vorgehensweise

zu vermeiden. Eigenschaften, die nicht unbedingt die Verwendung linearer Polymere erfordern, können zum Beispiel in der besseren Formbarkeit der Herstellung von Probenkörpern spezieller Geometrie, der Porosität von Probenkörpern für die allgemeine Freisetzung von Wirkstoffen jedweder Art, insbesondere im Pharma- und Agrobereich, die Quellbarkeit, die leichtere chemische Modifizierbarkeit aufgrund leichter zugänglicher funktioneller Gruppen und anderes betreffen.

Okada et al. (J. Biol. Chem. (1974), 249, 126) beschreibt, daß in Gegenwart nativer Amylosucrase mit Verunreinigungen von Dextrinyltransferase zu spezifischen Verzweigungen im Molekül führt.

Bekannt ist ebenfalls, daß Primer die Aktivität nativer Amylosucrase beeinflusst.

Überraschender Weise zeigt sich, daß die Aktivität der biokatalytischen

Amylosucrase in Gegenwart biogener Stoffe nicht beeinträchtigt, sondern für die großtechnische Produktion vorteilhaft gesteigert ist.

Für die industrielle Produktion ist es von Bedeutung, wirtschaftlich wertvolle Produkte zu erhalten. Zudem sollen Produkte erhalten werden, die biokompatibel sind und für zahlreiche biowissenschaftliche und materialwissenschaftliche Anwendungen verwendet werden können. Der Vorteil solcher Produkte liegt darin, daß sie unter anderem für den Einsatz an und in Lebewesen, besonders im Humanbereich geeignet sind (Kosmetik, Lebensmittel, Pharmazie, Medizin) und durch die Biokompatibilität ebenfalls die Entsorgung nach ihrem Einsatz in

technischen Bereichen überwiegend problemlos ist.

Daher ist es Aufgabe der Erfindung biokatalytisch hergestellte Amylosucrase modifiziert in biotechnologischen Verfahren zur Polyglucan Herstellung einzusetzen und neue Produkte zu erhalten.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird dadurch gelöst, daß biokatalytisch hergestellte Polyglucansucrase in Gegenwart von biogenen Stoffen eingesetzt wird und zur Herstellung von Polyglucan und Polyglucanderivaten verwendet wird.

Erfindungsgemäß handelt es sich um eine modifizierte technische Lehre aus WO 95/31553.

Im Sinne dieser Erfindung umfaßt der Begriff Polyglucan und Polyglucanderivate insbesondere Amylose und Amyloserverivate.

Vorteilhaft ist die überraschend hohe Produkteinheitlichkeit der erhaltenen Polyglucan und Polyglucanderivate, insbesondere der erzielten Molekulargewichte. Je nach der Verwendung einzelner biogener Stoffe, insbesondere Enzyme, können sehr unterschiedliche Polyglucane und / oder Polyglucanderivate erhalten werden, deren Molekulargewicht von 10^3 bis 10^9 Dalton variieren. Bevorzugte Molekulargewichte liegen im Bereich von 5×10^3 bis 10^6 Dalton, besonders bevorzugt im Bereich von 5×10^3 bis 5×10^4 Dalton,

Vorteilhaft ist die Vielfalt der erhaltenen Produkte und deren möglichen

Kombination. Hieraus, insbesondere bei geeigneter Kombination der Polymere hinsichtlich ihrer Molekulargewichte und / oder zugrundeliegenden Primärstrukturen können besondere Eigenschaftsmerkmale kombiniert werden oder aber die Verarbeitbarkeit in spezieller Weise beeinflusst werden. Dies gilt insbesondere bei der Verarbeitung nach Verarbeitungsverfahren der klassischen Polymerchemie, insbesondere in technischen Anwendungen.

Die erfindungsgemäßen Polyglucane und Polyglucanderivate zeichnen sich darüber hinaus durch eine hohe Vielfalt aus, die durch die Polydispersität der Polyglucane und Polyglucanderivate bestimmt werden. Die Polydispersität kann dabei in weiten

Bereichen variieren. Dabei sind für verschiedene Verwendungen durchaus verschiedene Polydispersitäten von Interesse. Die Polydispersität, die sich aus dem Quotienten von Polymergewichtsmittelwert und Polymerzahlenmittelwert ergibt, kann von 1,0 bis 100 oder größer variieren, wobei für spezielle Anwendungen

5 Polydispersitäten im Bereich von 1,1 bis 15 bevorzugt sind. Besonders vorteilhaft zeichnen sich Polyglucane oder Polyglucanderivate aus, die Polydispersitäten im Bereich von 1,1 bis 5 aufweisen.

~~"Biokompatibel" im Sinne dieser Erfindung bedeutet, daß die eingesetzten~~

- 10 Polysaccharide einem vollständigen biologischen Abbau unterzogen werden und keine schädliche Anreicherung in der Nahrungskette insbesondere dem humanen Organismus erfolgt.

Unter biologischen Abbau ist dabei jedweder in vivo ablaufende Vorgang angesprochen, der zu einem Abbau oder Zerstörung des Polymers führt.

- 15 Insbesondere fallen ebenfalls hydrolytische oder enzymatische Prozesse in diesen Bereich. Für die Biokompatibilität der Polysaccharide sowie seiner Abbauprodukte (Metabolite) ist nicht zuletzt auch der naturidentische Charakter der eingesetzten Polysaccharide von hoher Bedeutung. Daher sind die in Frage kommenden Polysaccharide ebenfalls für den therapeutischen, diagnostischen oder
- 20 prophylaktischen Einsatz besonders geeignet.

Insbesondere können durch sogenannte Enzymgemische gesteigerte Ausbeuten an linearer Polyglucan und Polyglucanderivate erhalten werden.

-
- 25 Als vorteilhafte Enzyme kommen vorzugsweise in Betracht ohne, daß die nachfolgende Liste einen abschließenden Charakter hat: Transferasen und Glycosyltransferasen

- | | | |
|----|----------|-----------------------------|
| 30 | 2.4.1.1 | Phosphorylase. |
| | 2.4.1.2 | Dextrin dextranase. |
| | 2.4.1.5 | Dextran sucrose. |
| | 2.4.1.7 | Sucrose phosphorylase. |
| | 2.4.1.8 | Maltose phosphorylase. |
| 35 | 2.4.1.9 | Inulosucrase. |
| | 2.4.1.10 | Levansucrase. |
| | 2.4.1.11 | Glycogen (starch) synthase. |

	2.4.1.12	Cellulose synthase (UDP-forming).
	2.4.1.13	Sucrose synthase.
	2.4.1.14	Sucrose-phosphate synthase.
	2.4.1.15	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming).
5	2.4.1.16	Chitin synthase.
	2.4.1.17	UDP-glucuronosyltransferase.
	2.4.1.18	1,4-alpha-glucan branching enzyme.
	2.4.1.19	Cyclomaltodextrin glucanotransferase.
	2.4.1.20	Cellobiose phosphorylase.
10	2.4.1.21	Starch (bacterial glycogen) synthase.
	2.4.1.22	Lactose synthase.
	2.4.1.23	Sphingosine beta-galactosyltransferase.
	2.4.1.24	1,4-alpha-glucan-6-alpha-glucosyltransferase.
	2.4.1.25	4-alpha-glucanotransferase.
15	2.4.1.26	DNA alpha-glucosyltransferase.
	2.4.1.27	DNA beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.28	Glucosyl-DNA beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.29	Cellulose synthase (GDP-forming).
	2.4.1.30	1,3-beta-oligoglucan phosphorylase.
20	2.4.1.31	Laminaribiose phosphorylase.
	2.4.1.32	Glucomannan 4-beta-mannosyltransferase.
	2.4.1.33	Alginate synthase.
	2.4.1.34	1,3-beta-glucan synthase.
	2.4.1.35	Phenol beta-glucosyltransferase.
25	2.4.1.36	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (GDP-forming).
	2.4.1.37	Glycoprotein-fucosylgalactoside alpha-galactosyltransferase.
	2.4.1.38	Beta-N-acetylglucosaminyl-glycopeptide beta-1,4-galactosyltransferase.
	2.4.1.39	Steroid N-acetylglucosaminyltransferase.
	2.4.1.40	Glycoprotein-fucosylgalactoside alpha-N-
30	acetylglucosaminyltransferase.	
	2.4.1.41	Polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase.
	2.4.1.43	Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase.
	2.4.1.44	Lipopolysaccharide galactosyltransferase.
	2.4.1.45	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase.
	2.4.1.46	1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase.
	2.4.1.47	N-acylsphingosine galactosyltransferase.
	2.4.1.48	Heteroglycan alpha-mannosyltransferase.
	2.4.1.49	Cellodextrin phosphorylase.
40	2.4.1.50	Procollagen galactosyltransferase.
	2.4.1.52	Poly(glycerol-phosphate) alpha-glucosyltransferase.
	2.4.1.53	Poly(ribitol-phosphate) beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.54	Undecaprenyl-phosphate mannosyltransferase.
45	2.4.1.55	Transferred entry: 2.7.8.14.
	2.4.1.56	Lipopolysaccharide N-acetylglucosaminyltransferase.
	2.4.1.57	Phosphatidyl-myo-inositol alpha-mannosyltransferase.
	2.4.1.58	Lipopolysaccharide glucosyltransferase I.
50	2.4.1.60	Abequosyltransferase.
	2.4.1.62	Ganglioside galactosyltransferase.

- 2.4.1.63 Linamarin synthase.
 2.4.1.64 Alpha, alpha-trehalose phosphorylase.
 2.4.1.65 Galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase.
 2.4.1.66 Procollagen glucosyltransferase.
 5 2.4.1.67 Galactinol-raffinose galactosyltransferase.
 2.4.1.68 Glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase.
 2.4.1.69 Galactoside 2-L-fucosyltransferase.
 2.4.1.70 Poly(ribitol-phosphate) N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.71 Arylamine glucosyltransferase.
 10 2.4.1.72 Transferred entry: 2.4.2.24.
 2.4.1.73 Lipopolysaccharide glucosyltransferase II.
 2.4.1.74 Glycosaminoglycan galactosyltransferase.
 2.4.1.75 UDP-galacturonosyltransferase.

 2.4.1.78 Phosphopolyprenol glucosyltransferase.
 15 2.4.1.79 Galactosylgalactosylglucosylceramide beta-D-acetyl-
 galactosaminyltransferase.
 2.4.1.80 Ceramide glucosyltransferase.
 2.4.1.81 Flavone 7-O-beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.82 Galactinol--sucrose galactosyltransferase.
 20 2.4.1.83 Dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase.

 2.4.1.85 Cyanohydrin beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.86 Glucosaminylgalactosylglucosylceramide beta-galactosyltransferase.
 2.4.1.87 Beta-galactosyl-N-acetylglucosaminylglycopeptide alpha-1,3-
 25 galactosyltransferase.
 2.4.1.88 Globoside alpha-N-acetylglactosaminyltransferase.

 2.4.1.90 N-acetyllactosamine synthase.
 2.4.1.91 Flavonol 3-O-glucosyltransferase.
 30 2.4.1.92 (N-acetylneuraminy)-galactosylglucosylceramide
 N-acetylglactosaminyltransferase.
 2.4.1.93 Inulin fructotransferase (depolymerizing).
 2.4.1.94 Protein N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.95 Bilirubin-glucuronoside glucuronosyltransferase.
 2.4.1.96 Sn-glycerol-3-phosphate 1-galactosyltransferase.
 2.4.1.97 1,3-beta-glucan phosphorylase.

 2.4.1.99 Sucrose 1F-fructosyltransferase.
 2.4.1.100 1,2-beta-fructan 1F-fructosyltransferase.
 2.4.1.101 Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-
 40 acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.102 Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-
 acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.103 Alizarin 2-beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.104 O-dihydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase.
 45 2.4.1.105 Vitexin beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.106 Isovitexin beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.109 Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase.
 2.4.1.110 tRNA-queuosine beta-mannosyltransferase.
 2.4.1.111 Coniferyl-alcohol glucosyltransferase.
 50 2.4.1.112 Alpha-1,4-glucan-protein synthase (UDP-forming).
 2.4.1.113 Alpha-1,4-glucan-protein synthase (ADP-forming).

- 2.4.1.114 2-coumarate O-beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.115 Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase.
 2.4.1.116 Cyanidin-3-rhamnosylglucoside 5-O-glucosyltransferase.
 2.4.1.117 Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase.
 5 2.4.1.118 Cytokinin 7-beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.119 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase.
 2.4.1.120 Sinapate 1-glucosyltransferase.
 2.4.1.121 Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.122 Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase.
 10 2.4.1.123 Inositol 1-alpha-galactosyltransferase.
 2.4.1.124 N-acetyllactosamine 3-alpha-galactosyltransferase.
 2.4.1.125 Sucrose-1,6-alpha-glucan 3(6)-alpha-glucosyltransferase.
 2.4.1.126 Hydroxycinnamate 4-beta-glucosyltransferase.

 2.4.1.127 Monoterpenol beta-glucosyltransferase.
 15 2.4.1.128 Scopoletin glucosyltransferase.
 2.4.1.129 Peptidoglycan glycosyltransferase.
 2.4.1.130 Dolichyl-phosphate-mannose-glycolipid alpha-mannosyltransferase.
 2.4.1.131 Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase.
 2.4.1.132 Glycolipid 3-alpha-mannosyltransferase.
 20 2.4.1.133 Xylosylprotein 4-beta-galactosyltransferase.
 2.4.1.134 Galactosylxylosylprotein 3-beta-galactosyltransferase.
 2.4.1.135 Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase.
 2.4.1.136 Gallate 1-beta-glucosyltransferase.
 2.4.1.137 Sn-glycerol-3-phosphate 2-alpha-galactosyltransferase.
 25 2.4.1.138 Mannotetraose 2-alpha-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.139 Maltose synthase.
 2.4.1.140 Alternansucrase.
 2.4.1.141 N-acetylglucosaminyl diphosphodolichol N-acetylglucosaminyltransferase.
 30 2.4.1.142 Chitobiosyl diphosphodolichol alpha-mannosyltransferase.
 2.4.1.143 Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.144 Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.145 Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase.

 2.4.1.146 Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.147 Acetylgalactosaminyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase.
 40 2.4.1.148 Acetylgalactosaminyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.149 N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.150 N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase.
 45 2.4.1.151 N-acetyllactosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase.
 2.4.1.152 Galactoside 3-fucosyltransferase.
 2.4.1.153 Dolichyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase.
 2.4.1.154 Globotriosylceramide beta-1,6-N-acetylgalactosaminyltransferase.
 2.4.1.155 Alpha-1,3(6)-mannosylglycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase.
 50 2.4.1.156 Indolylacetyl-myo-inositol galactosyltransferase.

	2.4.1.157	1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase.
	2.4.1.158	13-hydroxydocosanoate 13-beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.159	Flavonol-3-O-glucoside L-rhamnosyltransferase.
	2.4.1.160	Pyridoxine 5'-O-beta-D-glucosyltransferase.
5	2.4.1.161	Oligosaccharide 4-alpha-D-glucosyltransferase.
	2.4.1.162	Aldose beta-D-fructosyltransferase.
	2.4.1.163	Beta-galactosyl-N-acetylglucosaminylgalactosyl-glucosylceramide Beta-1,3-acetylglucosaminyltransferase.
10	2.4.1.164	Galactosyl-N-acetylglucosaminylgalactosyl-glucosylceramide beta-1,6- N-acetylglucosaminyltransferase.
	2.4.1.165	N-acetylneuraminylgalactosylglucosylceramide beta-1,4-N- acetylglactosaminyltransferase.
	2.4.1.166	Raffinose--raffinose alpha-galactosyltransferase.
	2.4.1.167	Sucrose 6(F)-alpha-galactosyltransferase.
15	2.4.1.168	Xyloglucan 4-glucosyltransferase.
	2.4.1.169	Xyloglucan 6-xylosyltransferase.
	2.4.1.170	Isoflavone 7-O-glucosyltransferase.
	2.4.1.171	Methyl-ONN-azoxymethanol glucosyltransferase.
	2.4.1.172	Salicyl-alcohol glucosyltransferase.
20	2.4.1.173	Sterol glucosyltransferase.
	2.4.1.174	Glucuronylgalactosylproteoglycan beta-1,4-N- acetylglactosaminyltransferase.
	2.4.1.175	Glucuronyl-N-acetylglactosaminylproteoglycan beta-1,4-N- acetylglactosaminyltransferase.
25	2.4.1.176	Gibberellin beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.177	Cinnamate glucosyltransferase.
	2.4.1.178	Hydroxymandelonitrile glucosyltransferase.
	2.4.1.179	Lactosylceramide beta-1,3-galactosyltransferase.
	2.4.1.180	Lipopolysaccharide N-acetylmannosaminouronosyltransferase.
30	2.4.1.181	Hydroxyanthraquinone glucosyltransferase.
	2.4.1.182	Lipid-A-disaccharide synthase.
	2.4.1.183	Alpha-1,3-glucan synthase.
	2.4.1.184	Galactolipid galactosyltransferase.
	2.4.1.185	Flavonone 7-O-beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.186	Glycogenin glucosyltransferase.
	2.4.1.187	N-acetylglucosaminyldiphosphoundecaprenol N-acetyl-beta-D- mannosaminyltransferase.
	2.4.1.188	N-acetylglucosaminyldiphosphoundecaprenol glucosyltransferase.
	2.4.1.189	Luteolin 7-O-glucuronosyltransferase.
40	2.4.1.190	Luteolin-7-O-glucuronide 7-O-glucuronosyltransferase.
	2.4.1.191	Luteolin-7-O-diglucuronide 4'-O-glucuronosyl-transferase.
	2.4.1.192	Nuatigenin 3-beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.193	Sarsapogenin 3-beta-glucosyltransferase.
	2.4.1.194	4-hydroxybenzoate 4-O-beta-D-glucosyltransferase.
45	2.4.1.195	Thiohydroximate beta-D-glucosyltransferase.
	2.4.1.196	Nicotinate glucosyltransferase.
	2.4.1.197	High-mannose-oligosaccharide beta-1,4-N-acetyl- glucosaminyltransferase.
	2.4.1.198	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase.
50	2.4.1.199	Beta-mannosylphosphodecaprenol-mannooligosaccharide 6-mannosyltransferase.

- 2.4.1.200 Inulin fructotransferase (depolymerizing, difructofuranose-1,2':2',1-dianhydride-forming).
- 2.4.1.201 Mannosyl-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyl-transferase.
- 2.4.1.202 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
5 2-D-glucosyltransferase.
- 2.4.1.203 Zeatin O-beta-D-glucosyltransferase.
- 2.4.1.204 Zeatin O-beta-D-xylosyltransferase.
- 2.4.1.205 Galactogen 6-beta-galactosyltransferase.
- 2.4.1.206 Lactosylceramide 1,3-N-acetyl-beta-D-glucosaminyl-transferase.
- 10 2.4.1.207 Xyloglucan:xyloglucosyl transferase.
- 2.4.1.208 Diglucosyl diacylglycerol (DGlcDAG) synthase.
-
- 2.4.2.1 Purine-nucleoside phosphorylase.
- 2.4.2.2 ~~Pyrimidine-nucleoside phosphorylase.~~
-
- 2.4.2.3 Uridine phosphorylase.
- 15 2.4.2.4 Thymidine phosphorylase.
- 2.4.2.5 Nucleoside ribosyltransferase.
- 2.4.2.6 Nucleoside deoxyribosyltransferase.
- 2.4.2.7 Adenine phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.8 Hypoxanthine phosphoribosyltransferase.
- 20 2.4.2.9 Uracil phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.10 Orotate phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.11 Nicotinate phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.12 Nicotinamide phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.13 Transferred entry: 2.5.1.6.
- 25 2.4.2.14 Amidophosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.15 Guanosine phosphorylase.
- 2.4.2.16 Urate-ribonucleotide phosphorylase.
- 2.4.2.17 ATP phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.18 Anthranilate phosphoribosyltransferase.
- 30 2.4.2.19 Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating).
- 2.4.2.20 Dioxotetrahydropyrimidine phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.21 Nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.22 Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase.
- 2.4.2.23 Deoxyuridine phosphorylase.
- 2.4.2.24 1,4-beta-D-xylan synthase.
- 2.4.2.25 Flavone apiosyltransferase.
-
- 2.4.2.26 Protein xylosyltransferase.
- 2.4.2.27 dTDP-dihydrostreptose-streptidine-6-phosphate
dihydrostreptosyltransferase.
- 40 2.4.2.28 5'-methylthioadenosine phosphorylase.
- 2.4.2.29 Queueine tRNA-ribosyltransferase.
- 2.4.2.30 NAD(+) ADP-ribosyltransferase.
- 2.4.2.31 NAD(P)(+)--arginine ADP-ribosyltransferase.
- 2.4.2.32 Dolichyl-phosphate D-xylosyltransferase.
- 45 2.4.2.33 Dolichyl-xylosyl-phosphate--protein xylosyltransferase.
- 2.4.2.34 Indolylacetylinoitol arabinosyltransferase.
- 2.4.2.35 Flavonol-3-O-glycoside xylosyltransferase.
- 2.4.2.36 NAD(+)--diphthamide ADP-ribosyltransferase.
- 2.4.2.37 NAD(+)--dinitrogen-reductase ADP-D-ribosyltransferase.
- 50 2.4.99.1 Beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase.
- 2.4.99.2 Monosialoganglioside sialyltransferase.

- 2.4.99.3 Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase.
- 2.4.99.4 Beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase.
- 2.4.99.5 Galactosyldiacylglycerol alpha-2,3-sialyltransferase.
- 2.4.99.6 N-acetyllactosaminide alpha-2,3-sialyltransferase.
- 5 2.4.99.7 (Alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase.
- 2.4.99.8 Alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase.
- 2.4.99.9 Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase.
- 2.4.99.10 Neolactotetraosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase.
- 10 2.4.99.11 Lactosylceramide alpha-2,6-N-sialyltransferase.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher die kostengünstige Derivatisierung von
15 Polyglucan.

Die Derivatisierung bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß die natürlicherweise im Polyglucan vorkommenden funktionellen Gruppen, Hydroxylgruppen (auch: Alkoholfunktionen), derivatisiert, ersetzt, modifiziert oder chemisch substituiert sind.
20 Unter Derivatisierung wird daher ebenfalls das Einführen von Verzweigungen mittels biogener Stoffe, insbesondere genannter Enzyme verstanden.

Derivate im Sinne dieser Erfindungen sind ebenfalls jene, die eine Umsetzung spezifisch an einem der C-Atome C-2, C-3 oder C-6 erfahren und zwar von > 0% bis
25 maximal 100 %, oder das Mischungen auftreten, d.h. unterschiedliche prozentuale Derivatisierungen an unterschiedlichen Positionen im C6 Körper einer Polyglucaneinheit. Im Fall der Hydroxylgruppe am C-6 Atom des Glucangrundkörpers im Polyglucan können insbesondere vorteilhafterweise

Verzweigungsgrade von 1% bis 40% erhalten werden. Insbesondere zeichnen sich
30 diese Polyglucanderivate durch Verzweigungsgrade von 2% bis 10 % aus. Insbesondere zeichnen sich die Art der Verzweigungen und die Anzahl der Verzweigungen in den beschriebenen Polyglucanderivaten dadurch aus, daß sie sich von denen der natürlichen, das heißt in der Natur vorkommenden Polyglucane, wie sie aus Pflanzen, Tieren oder anderen Organismen gewonnen werden können,
35 unterscheiden können.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist daher die modifizierte biokatalytische Herstellung von Polyglucan mittels biogener Stoffe. Dies bedeutet im Sinne dieser

Erfindung die Zugabe von biogenen Stoffen, während der biokatalytischen Herstellung der Amylosucrase (sogenannte in situ Reaktion) und/oder die Zugabe von biogenen Stoffen zur biokatalytisch hergestellten Amylosucrase und/oder die Nachbehandlung solcher hergestellter Produkte.

5

Insbesondere Mischungen von Amylosucrase oder anderen dem Durchschnittsfachmann bekannten Polyglucane synthetisierende Enzyme in der Gegenwart weiterer Moleküle mit enzymatischer Aktivität oder neutralem Verhalten, betreffend der Umsetzung zu Polyglucanen, welche jedoch einen positiven Einfluß

10 auf die Reaktion haben (im nach und vorstehenden "biogene Stoffe"). Diese Verbesserungen sind: Ausbeutesteigerungen, Verdau von Nebenprodukten (z.B. entstehender Fructose, dessen Abbauprodukte quasi als Nährmedium zum weiteren Polyglucan-Aufbau dienen) und andere für die enzymatische Reaktion bekannte Reaktionsparameter, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der
15 enzymatischen Reaktionen bekannt sind.

20

- "biogene" Stoffe können ebenfalls solche sein, welche vorzugsweise folgende Elemente aufweisen: C, H, O, N, P, S, B, Si, Se, S, Alkali-Metalle, Erdalkali-Metalle, Halogene, Co, Fe, Hg, und/oder über funktionelle Bindungen, welche von Kohlen-Wasserstoff-Bindungen abweichen, wie: Amid-, Phosphat-, Sulfat-, Carboxy-, Hydroxyl, Carbonyl-, Carbamyl-, Harnstoff-, Urethan-, Ester-, Ether-, Lacton, Lactam,

25

und/oder

30

- über Stoffklassen wie Peptide, Proteine, Enzyme, Nucleotide und Nukleinsäuren und andere dem Durchschnittsfachmann bekannte Stoffklassen - klassifiziert im Sinne der organischen Chemie und/oder
- eine Verbindung, die eine vorteilhafte biologische Aktivität aufweisen in biologischen Organismen.

Insofern können mittels der dargelegten Erfindung folgende Derivate erhalten

werden, ohne das die Aufzählung abschließend ist

A) Polyglucan-Ester

acetate

5 nitrate

phosphate

xanthogenate

citrate

10 B) Polyglucan-Ether

hydroxyethyl

hydroxypropyl

1,2-dihydroxypropyl

carboxymethyl

15

C) Polyglucan-Abbauprodukte durch Oxidation oder partielle Ringöffnung

Dialdehydamylose

Carboxyamylose

Persulfat abgebautes Polyglucan

20

D) Natürliche Polymere (naturidentische Polymere / Polyglucane)

Amylopektin

Glykogen

und/oder Pfropfpolymere, Blockpolymere, Copolymere; statistische Copolymere,

25 alternierende Copolymere und dendritische Copolymere, einschließlich Stern- und
Leiterpolymere sowie Bandpolymere.

Der Begriff Copolymer im Sinne dieser Erfindung umfaßt Polyglucan und / oder
Polyglucanderivate aus 2 oder mehr Grundeinheiten (Monomere).

30

Für den Erfindungsgegenstand ist es maßgebend entweder die genannte
Biotransformation in modifizierter Form durchzuführen oder das erhaltene
Polyglucanprodukt nach erfolgter Polymerisation in einer zweiten Reaktion,
bevorzugt einer Biokatalyse, zu verändern. Dies geschieht dadurch, daß das

Polyglucan oder Polyglucanderivat möglichst weitgehendst von allen Reaktionspartner / Parametern der Biotransformation isoliert und in einer weiteren Reaktion weiter verändert wird. Dies kann durch die Verwendung des Zusatzes von weiteren biogenen Verbindungen erfolgen, vorzugsweise Enzymen.

5

Eine andere Einteilung der verschiedenen Reaktionswege zur Herstellung von Polyglucanen und / oder Polyglucanderivaten kann folgendermaßen beschrieben werden.

Die Modifikation der Polyglucane oder Polyglucanderivate kann darüber erfolgen,

- 10 ob nur der Reaktionsverlauf der Biotransformation, also der Umsetzung von Saccharose und seinen Derivaten zu Polyglucan und / oder Polyglucanderivaten verändert werden soll (Dies kann zum Beispiel durch den Verzehr der bei der Biotransformation gebildeten Fruktose geschehen), oder es kann durch die Reaktion oder Reaktionsführung bei der Umsetzung von Amylosucrase mit
- 15 biogenen Stoffen direkt ein Polyglucan und / oder ein oder mehrere Polyglucanderivate gebildet werden. Dabei schließt das eine das andere nicht aus. Als Beispiel ist hier der veränderte Reaktionsverlauf zu nennen, der dadurch entsteht, daß man durch Phosphorylierung und / oder Methylierung und / oder Sulfatierung und / oder weitere Modifikationen eine erhöhte oder eine erniedrigte
- 20 Löslichkeit des Polyglucans erhält und auf diese Weise zum Beispiel veränderte Kettenlängen o.ä. erhält.

Eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, parallel zur Amylosucrase ein Enzym zu exprimieren, das die Amylosucrase modifiziert und auf

- 25 diese Weise veränderte Reaktionen hervorruft. Eine solche modifizierte Amylosucrase weist veränderte Enzymeigenschaften auf, die zu neuen Produkten führt, die zu aus der Mischung verschiedener Polyglucane oder Polyglucanderivate führt. Dem Fachmann sind derartige Mischungen auch unter dem Begriff "Polymerblends" bekannt. Beispielsweise könnten derartige modifizierte
- 30 Amylosucrasen bewirken, daß in ihrer chemischen Struktur variierte Zucker, Monosaccharide, Disaccharide, Oligosaccharide, besser in die Polymerstruktur eingebunden werden können, im Sinne einer schnelleren Reaktion oder im Sinne einer höheren Verträglichkeit mit anderen monomeren Zuckereinheiten, die in das Polymerrückgrat eingebaut werden. Aber auch ein Kettenabbruch, der zu speziellen

funktionellen Molekülen aufgrund ihrer speziellen Polymerendgruppen führen können, die besondere Eigenschaften aufweisen, z.B. oberflächenaktives Verhalten, im weitesten im Sinn von amphiphilen Molekülen, führt, ist nicht auszuschließen und kann sogar zur bevorzugten Reaktion werden.

5

Desweiteren können weitere modifizierende Enzyme z.B. im gleichen Operon wie die Amylosucrase kodiert sein, und mit diesem Enzym parallel gereinigt werden. Auf diese Weise entsteht bereits bei der Herstellung und Separation der Amylosucrase ein Mix von verschiedenen biogenen Stoffen, vorzugsweise verschiedenen

10 Enzymen inklusive Amylosucrase, die in einer Biokatalyse (Biotransformation) eingesetzt werden können.

Die enzymatisch, durch den Einsatz von biogenen Verbindungen modifizierten Polyglucane können als Ausgangsmaterial für weitere, chemische Modifikationen
15 eingesetzt werden.

Die Ausführung der Erfindung kann in vitro oder in vivo erfolgen. Die erfindungsgemäßen bevorzugten Expressionssysteme können sein Tiere und Pflanzen. Insbesondere fallen unter diese in vivo Methoden auch

20 Expressionssysteme wie etwa Säugetierzellen, Pilze, Algen, Protisten, Mikroorganismen, vorzugsweise E.coli.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polyglucanen und/oder Polyglucanderivaten, wobei biokatalytisch hergestellte

25 Amylosucrase mit biogenen Stoffen versetzt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die technische Verwendung der erfindungsgemäß erhaltenen Polyglucane und/oder Polyglucanderivate. Im Sinne dieser Erfindung sind folgende Verwendungen ausdrücklich genannt:

30 Verwendung als pharmazeutische und / oder agrochemische Formulierung zur Ausbringung in der Landwirtschaft (wie Tablette, Kapselinhaltsstoff, Suspensionen, Emulsionen und andere dem Durchschnittsfachmann auf den genannten Gebieten bekannten Formulierungen), Wirkstoffträger und/oder Depotformulierung, insbesondere Tablettenhilfsstoff, Verwendung als Lebensmittel und / oder

Lebensmittelzusatzstoff, Verwendung als kosmetischer Zusatzstoff. Diese vorteilhaften Verwendungen der erfindungsgemäßen Polyglucane sind begründet in der Wahrung der Biokompatibilität, durch die erfindungsgemäße Verwendung biogener Stoffe.

5

Wirkstoffe im Sinne dieser Erfindung sind vorzugsweise alle Verbindungen, die für den biologischen Organismus, insbesondere Mensch, Tier, Pflanze, einen pallativen oder kurativen Effekt aufweisen. Dabei fallen unter den Begriff Wirkstoff im allgemeinen Sinn auch agrochemische Verbindungen, mit fungizider, pestizider,

- 10 insektizider, herbizider Wirkung, jedoch auch allgemein solche Verbindungen, die einen nützlichen Effekt in der Land-, Forst- oder Gartenwirtschaft aufweisen, zum Beispiel Düngemittel. Auch Duft- oder Aromastoffe, die insbesondere im Lebensmittelbereich oder der Kosmetik Anwendungen finden, fallen unter den Begriff Wirkstoff. Insofern werden ausdrücklich alle Wirkstoffe mit einbezogen, die
15 einen therapeutischen und / oder prophylaktischen und / oder dekorativen Effekt aufweisen.

Beispiele

- Die Ausführungsbeispiele sind analog den Ausführungsbeispielen der WO
20 95/31553, die jedoch in Gegenwart von biogenen Stoffen durchgeführt werden.

1. Polyglucan und / oder Polyglucanderivate, erhältlich aus Amylosucrase in Gegenwart von mindestens einem biogenen Stoff.

5

2. Polyglucan und / oder Polyglucanderivate, nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet daß die Amylosucrase aus einer biokatalytischen Herstellung erhalten wird.

-
- 10 3. Polyglucan und / oder Polyglucanderivate nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet daß der biogene Stoff eine Transferase und / oder eine Glycosyltransferase ist.

- 15 4. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach Anspruch 1-3 dadurch gekennzeichnet, daß Amylosucrase in vivo exprimiert wird.

- 20 5. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach Anspruch 1-3 dadurch gekennzeichnet, daß Amylosucrase in vitro exprimiert wird.

6. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet, daß Amylosucrase mit anderen biogenen Stoffen, vorzugsweise Enzymen, exprimiert wird.

25

7. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet, daß Amylosucrase mit mindestens einem biogenen Stoff versetzt wird.

- 30 8. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß der biogene Stoff in situ zur biokatalytischen Herstellung von Amylosucrase zugegeben wird.

9. Verfahren zur Herstellung von Polyglucan und / oder Polyglucanderivat nach

Anspruch 1-8 dadurch gekennzeichnet, daß Amylosucrase mit einem biogenen Stoff versetzt wird.

10. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
5 Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 zur Verwendung als Wirkstoffträger.

11. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 zur Verwendung als Depotsystem für
mindestens einen Wirkstoff.

10

12. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 für den pharmazeutischen Bereich,
vorzugsweise Wirkstoffträger und/oder Tablettenhilfsstoff.

15

13. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 für den agrochemischen Bereich,
vorzugsweise als Wirkstoffträger.

20

14. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 für kosmetische Anwendungen.

15. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 als Lebensmittel und / oder
Lebensmittelzusatzstoff.

25

16. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 als Träger für Aromen und Duftstoffe.

30

17. Verwendung von mindestens einem Polyglucan und / oder einem
Polyglucanderivat nach Anspruch 1 bis 9 vorzugsweise als Wirkstoffträger für
Wirkstoffe mit einem therapeutischen oder prophylaktischem Effekt.